

課題情報シート

課題名：	スルホンアミド類の合成		
施設名：	近畿職業能力開発大学校		
課程名：	専門課程	訓練科名：	産業化学科
課題の区分：	総合制作実習課題	課題の形態：	研究

課題の制作・開発目的

(1) 課題実習の前提となる科目または知識、技能・技術

有機化学、無機化学、有機工業化学、基礎化学実験Ⅰ・Ⅱ、有機化学実験Ⅰ・Ⅱ、生物化学、生物化学実験、化学計算法Ⅰ・Ⅱ、工業化学実験、工業分析実験Ⅰ・Ⅱ

(2) 課題に取り組む推奨段階

有機化学、無機化学、有機工業化学、基礎化学実験Ⅰ・Ⅱ、有機化学実験Ⅰ・Ⅱ、生物化学、生物化学実験、工業化学実験、工業分析実験Ⅰ・Ⅱを終了後

(3) 課題によって養成する知識、技能・技術

課題を通して、高度な化学的現象や技術を総合的に理解し習得します。

(4) 課題実習の時間と人数

人数：6人

時間：288時間

スルホンアミド類は比較的合成が容易で結晶性が良く初心者には取り組みやすいテーマです。また、合成目的の一つである aliphatic sulfonamide(2)の抗菌活性は2007年に報告されたホットなテーマです。

講義や実習で学んだ断片的な知識を総合的に応用して目的とする有機化合物を合成し、その過程において発生する様々な問題を克服して、社会に出てから実地に応用できる高度な技術を体得させることを目的として、化合物群図1、図2、図3の合成を課題としました。

さらに、本テーマは、「sulfonamide類の構造と抗菌活性」を上位テーマにして、発表者を含む6人の実習生が個々の課題(末尾に記載)に取り組み、そのうち合成グループの4人が合計42のsulfonamide誘導体を合成し、微生物グループの2人が合計62化合物の抗菌力を測定しました。そして、実習生が合成と抗菌活性の情報を交換し合って自分たちが合成した化合物の抗菌活性発現の機構について検討することを全体の構想としました。これは医薬品開発における新規有効化合物の探索研究における初期過程に相当するものであり、実習生が、医薬品に限らずファインケミカル業界における有用な新規化合物の開発に対する理解を深める

ことも副次的な目的としました。

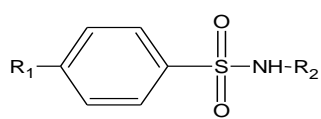


図 1

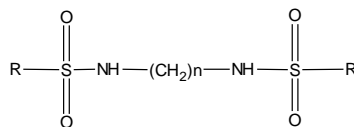


図 2

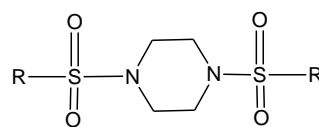


図 3

- | | |
|---|--------|
| 1. スルホンアミド類の合成 | 前野 日呂 |
| 2. benzenesulfonamide類の合成 | 新屋 大地 |
| 3. alkylene-bis(benzenesulfonamide)誘導体の合成 | |
| (その 1) p-methyl-および p-methoxy-置換体 | 廣瀬 佳那子 |
| 4. alkylene-bis(benzenesulfonamide)誘導体の合成 | |
| (その 2) p-amino-および p-chloro-置換体 | 高田 直人 |
| 5. sulfonamide 誘導体の抗菌活性 | |
| (その 1) 微生物実験室の清浄度の確認 | 堤 慎太郎 |
| 6. sulfonamide 誘導体の抗菌活性 | |
| (その 2) 化合物の抗菌力測定 | 柴崎 直也 |

課題の成果概要

6人全員で、当初に計画した42化合物の合成と、62化合物の抗菌力試験を達成しました。発表者個人には、化学反応式に基づく仕込み量の決定、反応条件の検討、抽出・再結晶・クロマトグラフィー等による混合物の分離精製、化学変換やFT-IRによる構造決定、互変異性体による混合物の生成など、高度な化学的現象や技術を総合的に理解習得させ、研究レベルの有機合成を体験させることができました。発表者が企業における化学関係のどのような業務についても、本校で学んだ知識を基に、自分で対処しようとする意欲と実力を身につけることができました。

加えて、6人の実習生が協力してスルホンアミド類の抗菌活性発現の機構について文献調査と議論を行い、自分たちが合成した化合物についてどのような置換基が強い抗菌力を示し、また抗菌活性発現機構におけるどのステージで作用しているかを予測しました。

実習生達は、医薬品開発に限らず、農薬、化粧品、染料、塗料、界面活性剤、食品添加物、香料、などファインケミカル工業界の新規有用化合物の開発に対する理解を深め、それに携わる基本を身に付けたと思われます。

課題制作・開発の訓練ポイントおよび所見

最初の段階で指導する6人全員に、以下のことを伝え徹底しました。

- 1) sulfonamide 基を有する化合物の化学的性質、生理活性、医薬品として実用化された化合物、など基本的な事項を紹介し、さらに個々のテーマに応じて調査が必要であること。
- 2) 合成グループに対しては、それぞれが合成した化合物を微生物グループが抗菌活性を測定するので、化合物の構造に誤りがないこと、また合成する期限があること。
- 3) 抗菌グループは、化合物ができてくるまでのしばらくの間に、使用する細菌（大腸菌および枯草菌）を同定し、実験室が抗菌力の測定に適した清浄度を維持しているか否かを落下菌法と付着菌法によって確認すること、抗菌力測定の方法(MIC 法およびペーパーディスク法)を習得すること。さらに使用する細菌で周囲を汚染しない対策をルール化すること。
- 4) ある程度目的とする化合物が合成され、合成された化合物の抗菌活性が明らかになった段階で文献の調査を行い、スルホンアミド類の抗菌活性発現の機構を検討し自分たちの化合物がどのように抗菌力を発現するかを予測すること。その結果は微生物グループの論文として報告すること。
- 5) 合成目的の一つである aliphatic sulfonamide(2)の合成と抗菌活性は2007年に報告され、我々はさらにそれを発展させた誘導体を合成するので、合成は非常にホットなテーマであること。
- 6) 我々が合成する化合物は単純な構造であるが、類似した化合物が新薬の耐性菌に効果があることが2008年になって報告され、これもホットで重要な情報であること。

計画を伝えた段階において、学生たちは大いに興味を持ちました。最初の3カ月は二人1組で実験を行い、少し慣れた段階で個々のテーマに分かれ、それぞれの責任においてデータをとらせまとめさせました。

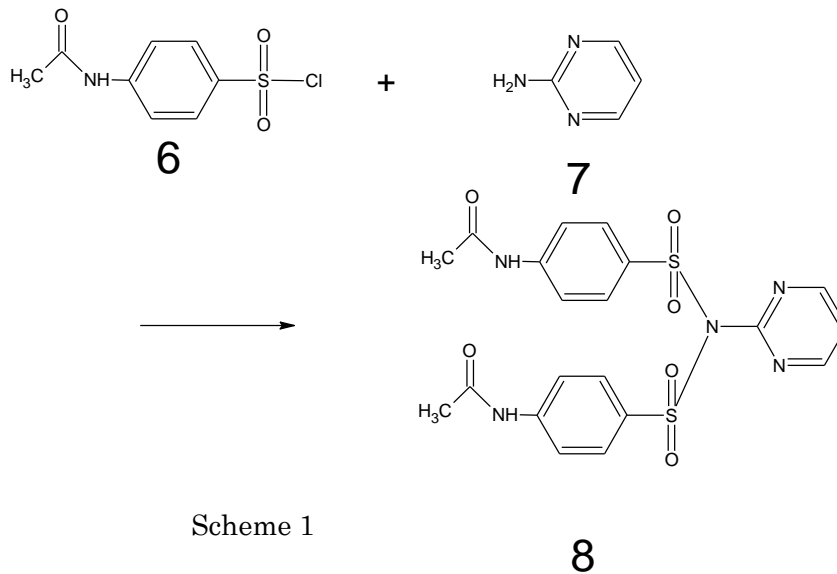
以下、発表者の課題を中心に報告します。

課題 1. benzenesulfonamide 誘導体の合成

最初の実験です。指導者が実際の装置を組み、試薬を秤り取り、反応させ、後処理をして、再結晶、濾過、乾燥するまでを実験して見せました。

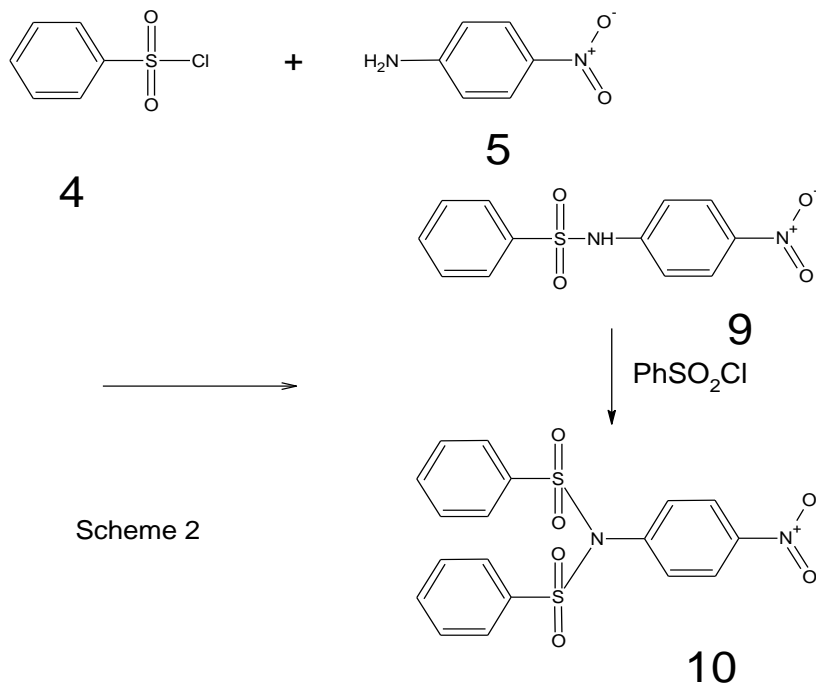
p-nitroaniline (5) を acetone-pyridine の混合溶媒中、氷冷下に 1.2 倍量の benzenesulfonyl chloride (4) を加え、室温で一夜、さらに冷蔵庫中で 6 日間放置すると TLC において 2 種の化合物が生成しました。それに対し、混合物を EtOH から分別再結晶して針状結晶 (m.p.157.6°C) と粒状結晶 (m.p.223.9°C) に分離精製させ、融点、FT-IR、TLC などにより単一物であることと sulfonamide 基があることを確認させました。

その上で、類似の文献 ¹⁾(Scheme1) を示し、自分たちのケースも同じ反応が起こっていることを予測させました。



構造を化学的に確認させるために以下の実験をさせ、実際の反応は Scheme 2 のように bis-sulfonyl 体が生成していることを確認させました。

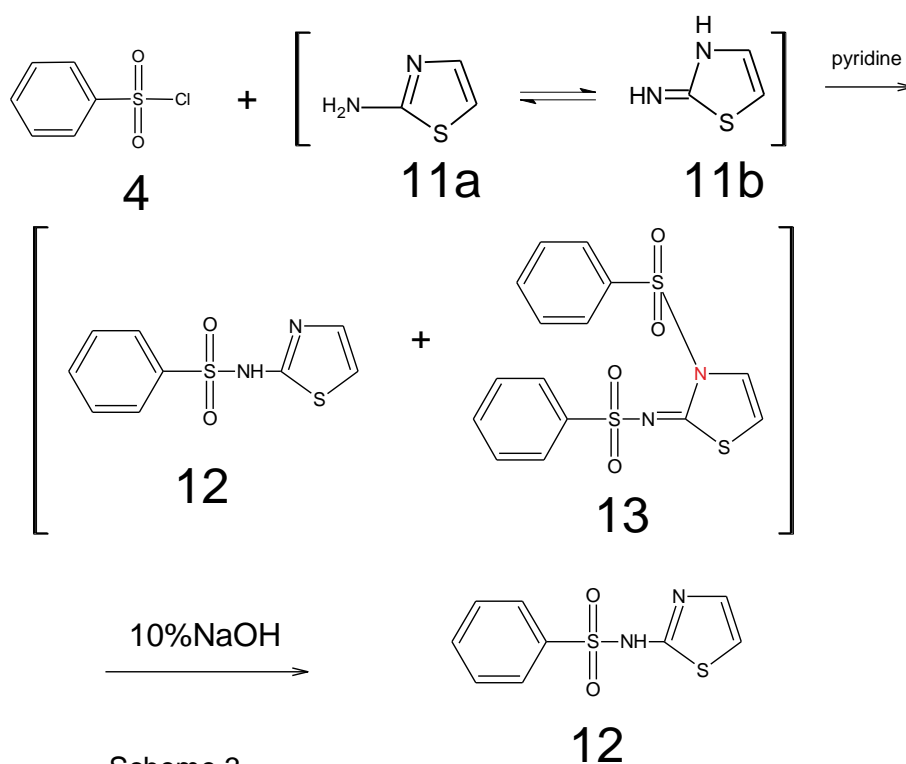
すなわち、針状結晶は 10%NaOH に溶けないが、粒状結晶は溶けます。また両化合物は IR スペクトルにおいてともに S=O の伸縮振動が 1380cm^{-1} および 1180cm^{-1} に認められること、また粒状結晶にさらに benzenesulfonylchloride(4)を反応させると針状結晶の化合物になることを IR スペクトルで同定することにより確認させました。



次の目的化合物の合成に着手させました。

2-aminothiazole(**11**)に pyridine の存在下 benzenesulfonyl chloride(**4**)を反応させると、TLC において 2 種の混合物が得られました。

2-aminothiazole は芳香族第 1 級アミン(**11a**)の性質を示すと同時に 2-thiazolone imide(**11b**)の性質を示すことが知られており²⁾、この互変異性体により mono-sulfonyl 置換体(**12**)および bis-sulfonyl 置換体(**13**)の 2 種の化合物が生成したことを指導員から学生に文献を示して示唆しました。さらに thiazolone 環の N に結合した sulfonyl 基はアルカリ加水分解で容易に脱離することがわかっており、学生と指導員が相談した結果、混合物を単離することなく 10%NaOH と加熱して単一の sulfonamide(**12**)を得ることができました。



合成した benzenesulfonamide 誘導体を表 1 に示します。

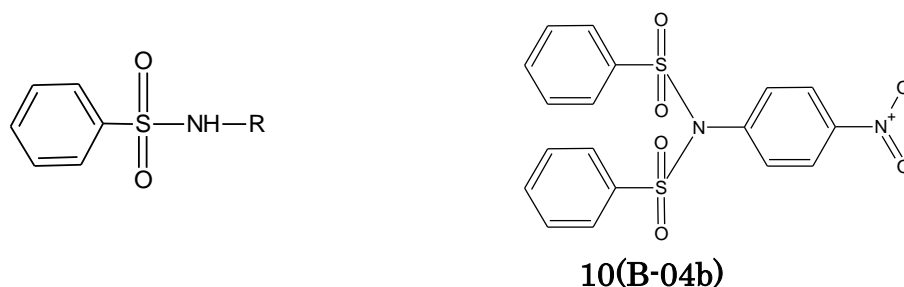
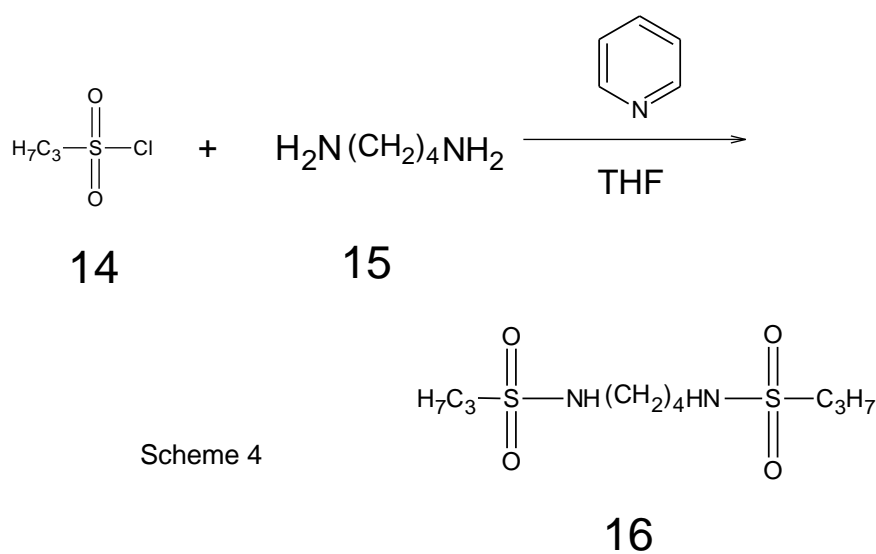


表 1 合成した sulfonamide 誘導体

化合物番号	R	収率%	m.p.°C	分子式
9(B-04)	4-nitrophenyl	56.2	154.2-157.6	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ SO ₄
10(B-04b)		2.7	221.7-223.9	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ SO ₅
12(B-07)	2-thiazolyl	25.1	185.9-186.7	C ₉ H ₈ N ₂ S ₂ O ₂

aliphatic sulfonamide の合成

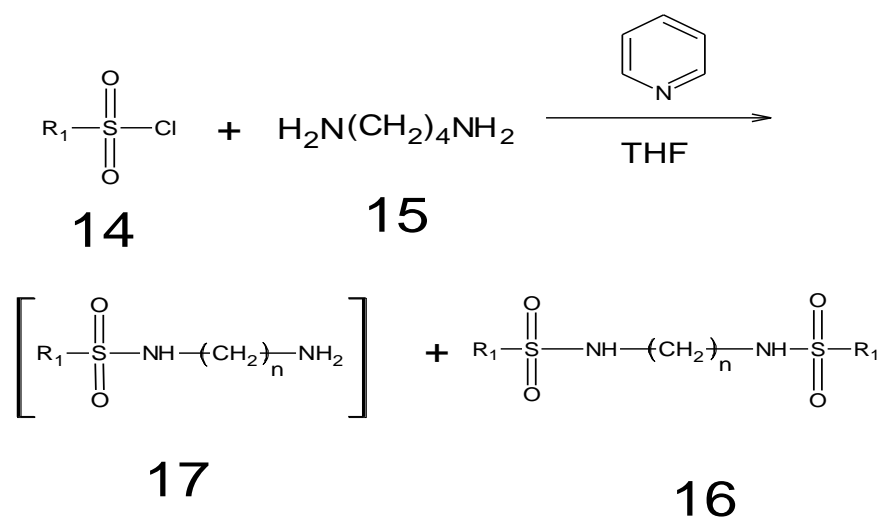
aliphatic sulfonamide(**16**)は Scheme 4 に従って aliphatic sulfonyl chloride(**14**)と aliphatic diamine(**15**)の反応により合成することを指導しました。最初に学生は、pyridine を脱 HCl 剤として用い、1,4-diaminobutane(**15**)の 1 に対して 2 倍モルの 1-propanesulfonyl chloride(**14**)を THF 中-5~-10°Cで反応させて目的とする bis-sulfonyl amide(**16**)を得ました。



一方、Ozbek 等³⁾によれば、sulfonyl chloride(**14**)の1 mol に対して diamine(**15**)の2倍 mol を THF 中で反応させ、bis-sulfonyl amide(**16**)を得ています。diamine(**15**)を脱 HCl 剤として用いているが diamine(**15**)が sulfonyl chloride(**14**)に対して過剰にあるため mono-sulfonyl amide(**17**)の副生が予測されます。文献の方法にしたがって sulfonyl chloride(**14**)(R=C₄H₉,C₃H₇)と diamine(**15**)(n=2,4)を反応させ、反応混合物を SiO₂-CHCl₃のカラムクロマトにより分離させましたが得られたのは bis-sulfonylamide(**16**)のみであり、どのフラクションからも mono-sulfonyl amide(**17**)は得られませんでした。

学生は、他の化合物についても Ozbek の方法を用いて合成しましたが、反応後の処理にカラムクロマトを用いず、反応混合物を CHCl₃に溶かして塩基性物質を 1N-HCl で除去し、水洗してから無水硫酸ナトリウムで乾燥、CHCl₃を留去して残渣を ethanol/n-hexane から再結晶し bis-sulfonylamide(**16**)を結晶として得ました。再結晶技術の有用性を認識しての行動でした。

合成した aliphatic sulfonamide 誘導体を表 2 に示します。



Scheme 5

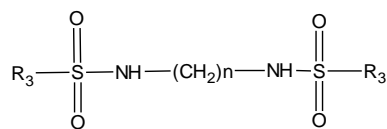


表 2 合成した aliphatic sulfonamide 誘導體

化合物番号	R ₃	n	収率 %	m.p. °C	分子式
16a	CH ₃ CH ₂ -	2	5.8	95.9-99.3	C ₆ H ₁₆ N ₂ S ₂ O ₄
16b	CH ₃ (CH ₂) ₂ -	2	7.7	106.2-107.2	C ₈ H ₂₀ N ₂ S ₂ O ₄
16c	CH ₃ (CH ₂) ₃ -	2	3.2	118.2-120.5	C ₁₀ H ₂₄ N ₂ S ₂ O ₄
16d	CH ₃ (CH ₂) ₂	3	8.9	103.2-104.5	C ₉ H ₂₂ N ₂ S ₂ O ₄
16e	CH ₃ CH ₂ -	4	3.7	116.3-118.0	C ₈ H ₂₀ N ₂ S ₂ O ₄
16f	CH ₃ (CH ₂) ₂ -	4	11.3	143.5-145.8	C ₁₀ H ₂₄ N ₂ S ₂ O ₄
16g	CH ₃ (CH ₂) ₃ -	4	10.5	156.5-157.6	C ₁₂ H ₂₈ N ₂ S ₂ O ₄

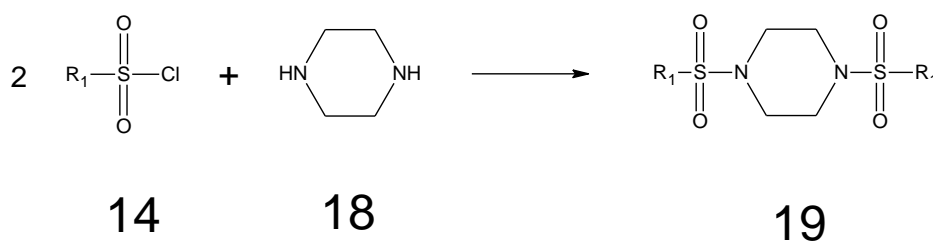
bis-(alkylsulfonyl) piperazine 誘導體の合成

上記の aliphatic sulfonamide をさらに発展させて中心の alkylenediamine が 6 員環を形成したと考えることができる piperazine 誘導體の合成に着手しました。抗菌活性の面からも期待され、学生も興味を持って合成に着手しました。

piperazine 誘導體については、確実に bis-sulfonyl 体を得るため、Scheme 6 にしたがって、piperazine(18)の 1 に対して sulfonyl chloride(14)の 2 倍モルを用い、pyridine-acetone 混合物中氷冷下に反応させて、目的物(19)を得ました。

学生はすでに 10 化合物を合成しており、化学的なセンスも身につけてきました。自分で合成方法の決定、原料の選定、反応条件の決定、後処理の操作、再結晶溶媒の選定、FT-IR による構造の確認などをすることができました。また、指導者が予想した通りに化合物の結晶性が良く再結晶で容易に精製できたので、学生は成功体験とともに「化学の面白さ」も十分に感じていました。逆に抗菌活性測定グループは、化合物が水やアルカリに溶けないため、MIC の測定が困難であったのは予想外でした。いずれにしても、指導者は具体的には、活性炭処理の方法についてアドバイスをした程度でした。

合成した bis-(alkylsulfonyl) piperazine 誘導體を表 3 に示します。



Scheme 6

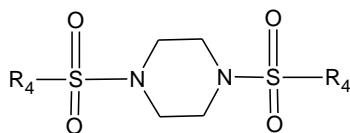


表 3 合成した bis-(alkylsulfonyl) piperazine 誘導体

化合物番号	R ₄	収率%	m.p. °C	分子式
19a	CH ₃ CH ₂ -	55.0	221.1-225.4	C ₈ H ₂₄ N ₂ S ₂ O ₄
19b	CH ₃ (CH ₂) ₂ -	39.1	207.5~209.6	C ₁₀ H ₂₄ N ₂ S ₂ O ₄
19c	CH ₃ (CH ₂) ₃ -	69.0	199.5~200.7	C ₁₂ H ₂₆ N ₂ S ₂ O ₄

FT-IR スペクトル

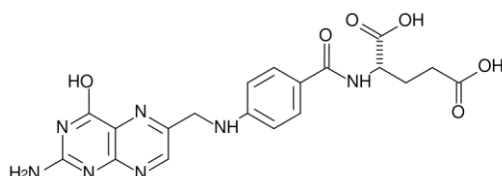
産業化学科には構造決定の機器としては FT-IR しかありません。GC-MS はあるが直接導入装置がないので、単純な化合物以外はカラム中で分解してしまい、分子イオンをはじめ化合物の特徴的なスペクトルが得られませんでした。学生には、NMR や元素分析、マススペクトルなども考慮して総合的に構造をきめるべきことを理解させたうえで、構造の確認は以下のデータに基づき FT-IR のみで行いました。

化合物 **9(B-04)**、**12(B-07)**には-SO₂-NH-が存在しますが N-H 伸縮振動を帰属することができませんでした。SO₂ 基における S=O 非対称伸縮振動が ν_{as} 1310~1380cm⁻¹、S=O 対称伸縮振動が ν_s 1120~1180cm⁻¹ にそれぞれ認められ、sulfonamide の構造を支持するデータでした。

化合物 **16a (C-01)** ~ **16g(C-09)**は非環状 sulfonamide であり、N-H 伸縮振動が 3220~3300cm⁻¹ に認められ、また、SO₂ 基における S=O 非対称伸縮振動が ν_{as} 1300~1325cm⁻¹、S=O 対称伸縮振動が ν_s 1140~1160cm⁻¹ にそれぞれ認められ、いずれも構造を支持するデータでした。

化合物 **19a(C-10)**~**19c(C-12)**は2級アミンの sulfonamide であり、N-H 伸縮振動は認められません。piperazine 環に結合した SO₂ 基における S=O 非対称伸縮振動が ν_{as} 1340~1360cm⁻¹、S=O 対称伸縮振動が ν_s 1150~1160cm⁻¹ にそれぞれ認められ、いずれも sulfonamide の構造を支持するデータでした。

サルファ剤は細菌に対して静菌的に作用するが、その作用機序はビタミンの1種である葉酸 (folic acid) の生合成を阻害することが特徴です。一方、動物細胞内では葉酸を合成する仕組みがなく、したがってサルファ剤は細菌にのみ毒性を示して動物細胞には作用しない選択毒性のすぐれた薬剤であると言われています。



葉酸 (folic acid)

上記のような一般的な知識から出発して、以下のような文献情報⁵⁾も学生に提供しました。

図1に示されるように、細菌細胞内ではプテリジン (pteridine)、p-アミノ安息香酸 (p-aminobenzoic acid, PABA) およびグルタミン酸から葉酸が合成されます。しかしながら、サルファ剤の基本構造である sulfanilamide 部分が p-アミノ安息香酸に類似しているため、葉酸合成の初期過程において、pteridine と PABA を結合する酵素 (DHPS) の反応を PABA と競合して阻害します。したがってプテリジンとの結合部位であるアミノ基は必須の構造です⁷⁾。

また葉酸は体内で還元され、dihydrofolate を経て tetrahydrofolate に変換されたのちにプリン体合成の補酵素として働きます。その結果として細菌の核酸や蛋白の合成が阻害されて抗菌活性が発現するといわれています。サルファ剤と同時に投与して抗菌力を高める trimethoprim は葉酸の還元過程の酵素である DHFR に作用することが知られていますが、ベンゼン環にアミノ置換基を持たない化合物が抗菌力を発揮する場合は、サルファ剤とは異なったステージに作用していると考えられました。

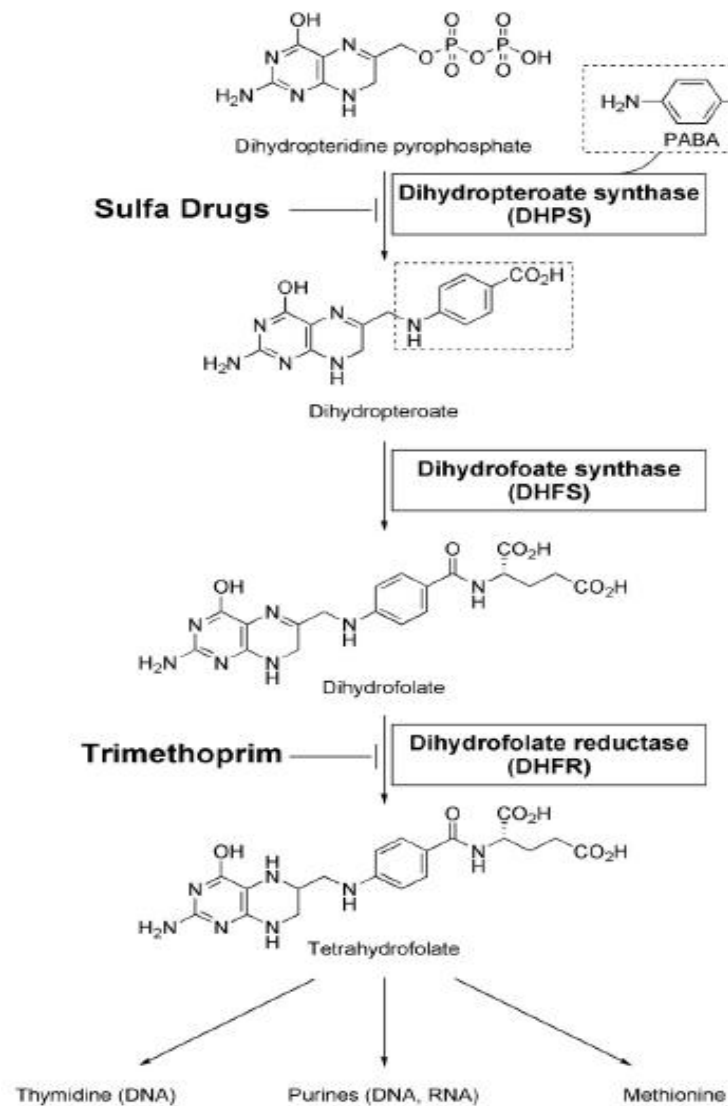


図1. 葉酸の生合成経路と抗菌剤の関係

実習生が合成した化合物についても、PABAに相当する p-aminophenyl 基を持った化合物の抗菌活性が最も強く、実用化されたサルファ剤はすべてその構造を有しています。また、p-amino 基を持たない化合物や脂肪族の sulfonamide 類も弱いながらも抗菌活性を示したが、それらの化合物は上記の trimethoprim と同様に DHFS 以外のステージで抗菌力を発現しているとの結論に至りました。

本題ではないので詳細は省くが、学生たちは与えられた文献を基にディスカッションを重ね、自分たちが合成し抗菌活性を測定した化合物のデータと、文献のデータを対比しながら上記の結論を導きました。科学的な証明がなされたわけではありませんが、一定の結論を導く過程において、論理的な思考方法を練習することができました。指導員の役割は、英語の論文を翻訳して示し、学生を集合させてディスカッションの場を提供し、一定の結論に導いたことです。

可能な限り学生の主体性に任せたが、ポイントにおいては常に具体的な方向を示さなくて

は議論も作業も前に進みませんでした。専門課程の実習としては必要なことであると考えています。

養成する能力 (知識、技能・技術)	課題制作・開発のポイント	訓練（指導）ポイント
○ 産業界の業務をある程度総合的に体験させる	◇ 製薬業界における新規有効化合物の探索研究の一部を体験させるため、合成グループと微生物グループに分けて役割を分担させました。	● 42化合物を合成させ、62化合物の抗菌活性を測定させて、その結果をもとに合成した化合物の作用機構を議論しました。
○ 専門課程の学生です。失敗も大切な経験ですが、成功体験も実習のモチベーションを高めるために必要かと考えました。	◇合成経路が単純で反応条件の設定が容易であり、生成物の結晶性が比較的良く精製しやすい化合物群を選定しました。	● スルホンアミド化合物を目標化合物として選定し、原料の一つである sulfonyl chloride は試薬として購入できるものを目標化合物として選定しました。
○合成グループの学生達は産業界で行われている有機合成についての高度な知識技術を習得します。	◇スタート時点においては学生実習程度の知識しかありません。何をするのかイメージする段階から出発です。	●指導者が実際の装置を組み、試薬を秤りとり、反応させ、後処理をして再結晶、濾過、乾燥までを実験して見せました。
○微生物グループの学生達も産業界で行われている微生物の扱いに関する高度な知識技術を習得します。 バイオハザード対策も実際に体験します。	◇微生物実験の技術に関しては生化学実験で微生物を扱った程度であり、化学よりもわかっていません。	●合成グループと同様に最初に指導員がやって見せ、その後一回は学生と一緒に実験をしました。
○合成の過程における予期しない副生物の構造も決定します。	◇副生物の少ない合成経路を選定することが第一ですが、それでも副生する化合	●反応経路から副生する化合物を予測させ、また類似の文献を示して IR スペクトル

養成する能力 (知識、技能・技術)	課題制作・開発のポイント	訓練（指導）ポイント
○ 合成した化合物の構造を決定する	物の構造を明らかにすることは化学をする上で非常に重要です。 ◇FT-IR しか使える分析機器はありません。NMR、MS、元素分析なども必要であることを理解させた上で、IRにより構造を推測させました。	のデータと矛盾がないことを検証させ、誘導体を合成して構造を確認させます。 ●IR スペクトルを詳細に解析して期待した構造と矛盾しないことを確認させました。

文献

- 1) W.Loop *et al*; Ann , **580** ,225 (1953)
- 2) 太田 ; 複素環化学 (上) ,培風館,p143(1965)
- 3) Ozbek *et al* ; Bioorganic & Medical Chemistry **15**,5105-5109(2007)
- 4) 微生物管理機構HP ; 微生物の用語解説
- 5) K.Namba *et al* ; Bioorganic & Medical Chemistry,**16**,6131-6144(2008)

課題に関する問い合わせ先

施設名 : 近畿職業能力開発大学校
住所 : 〒596-0103
 大阪府岸和田市稲葉町1778
電話番号 : 072-489-2112 (学務課)
施設 Web アドレス : <http://www.ehdo.go.jp/osaka/college/top.html>